

蕨菜多糖超声波辅助提取及其药理活性初步研究

郝经文^{1,2}, 陈霖³, 司华阳³, 陈乃富^{1*}, 陈乃东^{*}, 李彬¹, 刘孝全¹

¹皖西学院, 六安 237012; ²安徽中医药大学, 合肥 230031; ³湖北中医药大学, 武汉 430065

摘要:为优化蕨菜多糖的提取工艺,同时检测蕨菜多糖的药理学活性。实验采用超声波辅助提取法,在单因素试验的基础上,考察液料比、浸提次数、超声浸提时间、超声功率四因素对蕨菜多糖提取率的影响。运用 Design Expert 10.0 软件分析,通过响应面分析法(RSM)优化提取条件,对蕨菜多糖促进小鼠脾细胞增殖能力和抑制结肠癌细胞(HTC-8)增殖能力进行分析。结果表明:蕨菜多糖的优化提取工艺为:液料比:36.2:1;浸提次数:4次;超声浸提时间:43.1 min;超声波功率:240 W,在此条件下,蕨菜多糖提取效果最好,提取率达 8.60%。各因素对多糖提取率的影响程度:浸提次数 > 液料比 > 超声浸提时间 > 超声功率。通过药理活性研究表明,本实验获得的蕨菜多糖具有脾细胞免疫增值和抑制结肠癌细胞增殖活性。

关键词:蕨菜; 响应面法; 多糖; 免疫增强; 抗肿瘤

中图分类号: R284.2

文献标识码: A

文章编号: 1001-6880(2019)6-0957-08

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2019.6.006

Ultrasonic-assisted extraction and determination of polysaccharide in *Pteridium aquilinum* and preliminary study of pharmacological activities

HAO Jing-wen^{1,2}, CHEN Lin-lin³, SHI Hua-yang³,
CHEN Nai-fu^{1*}, CHEN Nai-dong^{1*}, LI Bin¹, LIU Xiao-quan¹

¹West Anhui university, Luan 237012, China; ²Anhui university of Chinese medicine, Hefei 230031, China;

³Hubei university of Chinese medicine, Wuhan 430065, China

Abstract: To optimize the extraction condition for the polysaccharide from *Pteridium aquilinum* and the pharmacological activities of polysaccharide were investigated in the study. The method of ultrasonic-assisted extraction was used, and on the basis of single factor test, the solid-liquid ratio, extraction times, extraction time and ultrasonic power were selected for the four-factor to target the influence as the yield of polysaccharide. Design expert 10.0 software was employed to analyze the test data and the response surface method (RSM) was applied to optimize the extraction conditions. Additionally the pharmacological activities of on tow radicals such as lymphocyte and colon cancer (HCT-8) cells proliferation were subsequently analyzed. The results suggested that optimum extraction consisted of a ration of the powder to reagent of 36.2:1 and extraction times of 4 and extraction time of 43.1 min each time with the ultrasonic powder of 240 W. The extraction yield of polysaccharide from *P. aquilinum* reached to 8.60%. The sequence of factors that worked on the extraction rate of polysaccharide was as follows: solid-liquid ratio > extraction times > extraction time > ultrasonic power. Moreover, the pharmacological activities experiment showed that polysaccharide extracted from *P. aquilinum* exhibited stronger activities to enhance hematopoiesis and inhibiting the HCT-8 cells growth.

Key words: *Pteridium aquilinum*; response surface methodology; polysaccharide; immune enhancement; anti-tumor

蕨菜是采自蕨科蕨属植物蕨 *Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn var. *latusculum* (Desv) Underw 的幼

嫩叶,别名拳头菜、如意菜、龙爪菜等,因其生长于天然林地,少受污染,是我国优质的绿色天然食品^[1-3]。

收稿日期: 2019-01-23 接受日期: 2019-04-09

基金项目: 国家自然科学基金(81573536); 中国博士基金特别资助(第9批)(2016T90559); 中国博士后研究面上项目(2014M551791); 安徽省自然科学基金面上项目(1608085MH221); 国家级大学生创新创业项目(006040217104, 006040217105); 皖西学院研究性学习项目(wxyx2018047, wxyx2018074)

* 通信作者 E-mail: naifuchen1962@163.com, 2004cnd@163.com

近年来,随着蕨菜野生资源的开发利用,对蕨菜中化学成分的研究主要集中于黄酮、氨基酸、矿物质、维生素等物质^[4-6],而对蕨菜多糖的研究相对较少。现代药理学研究表明,多糖作为一类重要的大分子化合物,具有免疫调节、抗肿瘤、抗氧化、降血糖及降血脂等药理作用,且毒性小,从而成为药效物质基础研究的热点^[7-10]。开展蕨菜多糖的研究对蕨菜资源的深度开发具有重要意义。

本实验以大别山区野生蕨菜为原料,利用超声辅助提取方法,在单因素试验基础上采用响应面设计优化超声辅助提取蕨菜多糖的工艺参数,以促进小鼠脾细胞增殖和抑制结肠癌细胞(HCT-8)增殖能力的研究为例,对获得的蕨菜多糖免疫增强活性和抗肿瘤活性进行初步评价,旨在为蕨菜多糖的深入研究和蕨菜资源开发提供参考依据。

1 材料与方 法

1.1 材 料

蕨菜材料采自于安徽省霍山县,品种经皖西学院陈乃东教授鉴定。幼嫩叶鲜品洗净,在低温冻干机中冻干至恒重,粉碎、过40目筛,密封备用。

1.2 试剂与仪器

主要试剂:葡萄糖(标准品)、刀豆蛋白A(ConA)、DMEM培养基,购于Sigma-aldrich试剂公司;无水乙醇(分析纯),购于上海振兴化工试剂公司;乙醚(分析纯),购于上海中试化工试剂公司;丙酮、氯仿、硫酸(分析纯),购于西陇化工试剂公司;正丁醇(分析纯),购于天津博迪试剂公司;紫杉醇(标准品)、葱酮、二甲基亚砷,均购于阿拉丁试剂公司;RPMI1640培养基,购于海克隆试剂公司;PBS溶液,购于上海立菲生物技术有限公司;红细胞裂解液,购自于Thermo试剂公司。

主要仪器与设备:TU-1901双光束紫外-可见分光光度计,北京普析通用仪器有限责任公司;KQ-5200B型超声波清洗器,昆山市超声仪器有限公司;HH-S6型数显恒温水浴锅,江苏金坛市金城国胜实验仪器厂;GL-200-II型离心机,上海安亭科学仪器厂;GL-20G-II电子分析天平,上海安亭科学仪器厂;202A-3型数显电热干燥箱,上海锦屏仪器仪表有限公司;BB15型二氧化碳培养箱,ThermoFisher仪器有限公司;Thermo Scientific Microplate Reader酶标仪,ThermoFisher仪器有限公司。

1.3 试验方法

1.3.1 标准曲线的制备

葡萄糖标准曲线的绘制参照文献^[11],用葱酮-硫酸法,于621 nm下测样品吸光度值,得回归方程 $A = 9.5614C + 0.0218$, $R^2 = 0.998$,A为吸光度,C为浓度,计算出各供试样品的多糖含量^[14-16]。

1.3.2 蕨菜样品粗多糖的提取及测定

准确称取0.5 g的蕨菜冻干粉,加入一定体积蒸馏水,超声波辅助提取、5 000 rpm离心,收集上清液,定容,得蕨菜总多糖提取液,备用。

精密吸取1.0 mL制备的多糖提取液,同“1.3.1操作”于621 nm下测吸光度值(A),计算出各供试样品的多糖含量^[14]。

1.3.3 蕨菜精制多糖的制备

蕨菜精制多糖的制备参照相关文献^[12],使用Sevag法除去粗多糖溶液中的蛋白质,冷冻干燥,得精制多糖。

1.3.4 单因素试验

采用单因素试验分别考察超声波辅助下液料比、浸提次数、超声浸提时间、超声功率4个因素对蕨菜多糖提取得率的影响。

1.3.5 响应面法试验因素水平设计

根据Box-Behnken的中心组合试验设计原理^[13-16],结合单因素试验结果,选择以液料比(X_1)、浸提次数(X_2)、超声浸提时间(X_3)、超声功率(X_4)作为相应变量,编码水平为-1,0和1,且以蕨菜多糖提取得率(Y)作为响应值,采用响应面法对蕨菜多糖提取条件进行优化。

1.3.6 蕨菜精制多糖对小鼠脾细胞增值的影响

小鼠脾淋巴细胞的制备参考文献^[17],小鼠短颈处死后,置于70%乙醇溶液中浸泡3 min,于无菌条件下取出脾脏,置于病理级载玻片,压碎,PBS缓冲溶液冲洗,过200目筛网,制得脾细胞悬浮液。将制得的细胞悬浮液置于离心管中,1 200 rpm离心5 min,除去上清,向离心管中加入1 mL红细胞裂解液,吹打均匀,静置4 min,1 200 rpm离心,除去上清液,加入适量的RPMI1640培养基,吹打均匀,使用台盼蓝染色,检测细胞活性在95%以上即可。

用RPMI1640培养基将蕨菜精制多糖配制0、1、5、10、50、100、500、1 000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 7个给药浓度。将小鼠淋巴细胞悬浮液加入96孔细胞培养板中,每孔100 μL , 5×10^5 个/孔,每孔加入10 μL 不同浓度药液,以等体积的RPMI1640培养基作为空白对照组,以最终浓度为5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的ConA给药为阳性对照

组,每组设置 5 个复孔。在 37 °C、5% CO₂ 条件下培养 24 h,采用 CCK-8 法检测^[18],每孔加入 10 μL 的 CCK-8 溶液,继续孵育 4 h,终止培养,在 490 nm 下测定其吸光度值,用多功能酶标仪测定吸光度值(OD),实验设 3 次重复。

1.3.7 蕨菜精制多糖对结肠癌细胞(HCT-8)增殖的影响

蕨菜精制多糖对结肠癌细胞(HCT-8)增殖抑制及细胞培养参考文献^[19],分别将结肠癌细胞 HCT-8 以 1×10^4 的数目接种于 96 孔细胞培养板中,每孔 100 μL,空白组加入等体积的 DMEM 培养基,37 °C、5% CO₂ 培养 12 h,待细胞贴壁后,加入不同浓度的蕨菜精制多糖药液 10 μL,以最终浓度为 100 nmol/L 的紫杉醇为阳性对照^[19],在 37 °C、5% CO₂ 条件下培养 24 h,采用 CCK-8 法检测,每孔加入 10 μL 的 CCK-8 溶液,继续孵育 4 h,终止培养,在 490 nm 下测定其吸光度值,用多功能酶标仪测定吸光度值(OD),实验设 3 次重复。

1.3.8 数据分析

使用统计分析软件 SPSS 23.0 和 Design Expert 10.0 对响应面法设计实验的结果进行分析,拟合二次多项式方程并绘制响应面图,确定蕨菜多糖的较佳提取工艺。

2 结果与分析

2.1 单因素试验

2.1.1 液料比对多糖提取得率的影响

在超声功率 240 W、浸提次数 3 次、超声浸提时间 30 min 的条件下,比较不同液料比对蕨菜多糖提取得率的影响如图 1 所示。

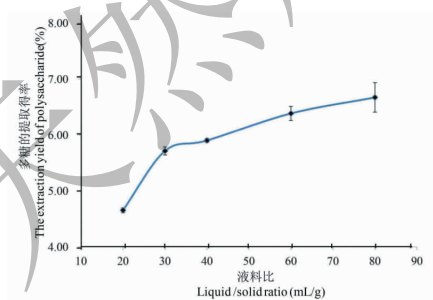


图 1 液料比对多糖提取得率的影响

Fig. 1 Effect of liquid /solid ratio on the extraction yield of polysaccharide

由图 1 可得,随着液料比的增大,多糖提取得率逐渐增大,当液料比(mL/g)在 20~40:1 时,多糖提取得率上升较快;当液料比大于 40:1 时,增长缓慢。

液料比为 60:1 和 80:1 时获得的蕨菜多糖提取得率差异无统计学意义,过多使用提取溶液会造成后续处理的难度,且提高成本,当液料比为 40:1 时获得较好的多糖提取得率,因此液料比控制在 40:1 为宜。

2.1.2 浸提次数对多糖提取得率的影响

在超声功率 240 W、超声浸提时间 30 min、液料比 30:1 (mL/g) 的条件下,比较不同浸提次数对蕨菜多糖提取得率的影响如图 2 所示。

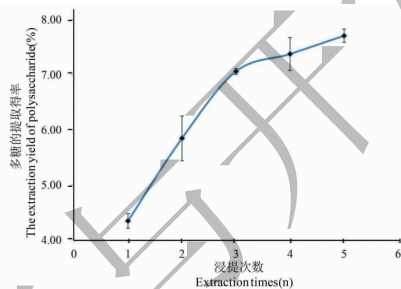


图 2 浸提次数对多糖提取得率的影响

Fig. 2 Effect of extraction times on the extraction yield of polysaccharide

由图 2 可得,浸提次数在 1~3 之间时,蕨菜多糖提取得率随浸提次数的增加而上升,浸提次数超过 3 次后,多糖提取得率的增加幅度趋于平缓,且浸提 3 次与浸提 4 次,浸提 5 次的蕨菜多糖提取得率差异不具有统计学意义,故浸提次数选择 3 次为宜。

2.1.3 超声浸提时间对多糖提取得率的影响

在超声功率 240 W、浸提次数 3 次、液料比 30:1 (mL/g) 的条件下,比较不同超声浸提时间对蕨菜多糖提取得率的影响如图 3 所示。

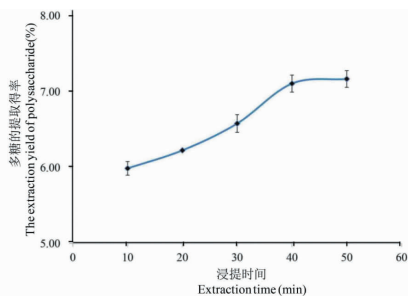


图 3 浸提时间对多糖提取得率的影响

Fig. 3 Effect of time on the extraction yield of polysaccharide

由图 3 可得,随着超声浸提时间的增加,多糖提取得率显著提高,但当超声浸提时间超过 40 min 后,多糖提取得率增长缓慢,且超声浸提时间为 40 min 和 50 min 时提取得率差异不具有统计学意义,考虑到节约成本等因素,选 40 min 作为超声浸提时

间为宜。

2.1.4 提取功率对多糖提取得率的影响

在超声浸提时间 30 min、浸提次数 3 次、液料比

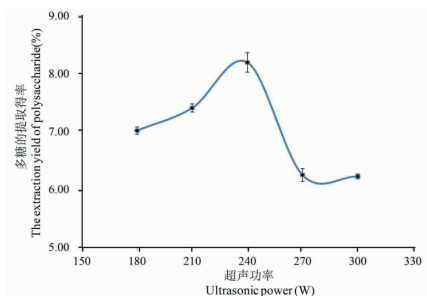


图4 提取功率对多糖提取得率的影响

Fig. 4 Effect of ultrasonic power on the extraction yield of polysaccharide

30:1 (mL/g) 的条件下,考察比较不同超声功率对蕨菜多糖提取得率的影响如图4所示。

由图4可得,超声功率在 180~240 W 时,多糖提取得率逐渐增大,当超声功率大于 240 W 时,多糖提取得率下降,说明超声功率对多糖提取得率的影响,既有正效应又有负效应,实际生产中应避免超声功率过大而引起得率下降,故选取超声功率 240 W 为宜。

2.2 四因素响应面分析结果

2.2.1 工艺参数优化

结合“2.1 单因素试验”结果,以液料比(X_1):30:1 (mL/g)、浸提次数(X_2):3 次、超声浸提时间(X_3):40 min(X_3)、超声功率(X_4):240 W 为中心点,用响应面分析方法进行四因素优化。中心试验设计及试验结果见表1。

表1 中心试验设计及试验结果

Table 1 Design and results of central composite experiment

试验序号 No.	液料比 (X_1) Liquid/solid ratio (mL/g)	浸提次数 (X_2) Extraction times (n)	超声浸提时间 (X_3) Extraction time (min)	超声功率 (X_4) Ultrasonic power (W)	多糖提取得率(Y) Yield of polysaccharide(%)	
					实测值 Test value	预测值 Predictive value
1	-1	0	-1	0	6.185	6.130
2	-1	0	1	0	7.195	6.785
3	1	0	0	-1	5.630	6.040
4	1	0	0	1	5.375	5.640
5	0	0	0	0	8.240	8.260
6	0	0	0	0	8.155	8.260
7	0	-1	-1	0	4.970	5.105
8	0	0	1	-1	5.820	5.530
9	-1	-1	0	0	5.925	5.790
10	1	0	-1	0	7.490	7.355
11	0	0	-1	1	4.445	4.565
12	1	0	1	0	8.460	7.970
13	0	1	0	1	5.075	4.930
14	0	-1	0	1	4.115	3.745
15	-1	1	0	0	5.660	5.500
16	0	0	1	1	5.905	5.730
17	0	0	0	0	8.270	8.260
18	0	0	0	0	8.425	8.260
19	0	-1	1	0	5.300	6.085
20	-1	0	0	-1	4.310	4.765
21	-1	0	0	1	4.205	4.510
22	0	-1	0	-1	4.205	3.805

续表 1 (Continued Tab. 1)

试验序号 No.	液料比 (X_1) Liquid /solid ratio (mL/g)	浸提次数 (X_2) Extraction times (n)	超声浸提时间 (X_3) Extraction time (min)	超声功率 (X_4) Ultrasonic power (W)	多糖提取得率(Y) Yield of polysaccharide(%)	
					实测值 Test value	预测值 Predictive value
23	0	1	0	-1	5.700	5.525
24	0	1	-1	0	6.970	6.905
25	1	-1	0	0	5.260	5.250
26	0	1	1	0	6.610	7.195
27	0	0	-1	-1	5.425	5.425
28	1	1	0	0	8.485	8.450
29	0	0	0	0	8.200	8.260

通过 Design Expert10.0 软件对数据进行多元拟合分析,获得以多糖提取得率 Y 为响应值对自变量(X_1 液料比、 X_2 浸提次数、 X_3 超声浸提时间、 X_4 超声功率)的二次多项回归方程: $Y=8.258+0.602X_1+0.727X_2+0.317X_3-0.164X_4+0.873X_1X_2-0.01X_1X_3-0.038X_1X_4-0.173X_2X_3-0.134X_2X_4+0.266X_3X_4-0.637X_1^2-1.375X_2^2-0.562X_3^2-2.382X_4^2$

X_3^2, X_4^2),二次项交互项(X_1X_3)对多糖提取得率的影响是高度显著($P>0.1$),其余一次项和二次项交互项对结果影响不显著($P>0.1$)。该模型的调整复相关指数 $R^2=91.74\%$ 说明该模型能解释 95.87% 响应值的变化;模型的 P 值为 0.001;说明模型的回归极显著;各因素对多糖提取得率的影响依次为:浸提次数(X_2) > 液料比(X_1) > 超声浸提时间(X_3) > 提取功率(X_4)。

从表 2 回归模型的方差分析显著性检验看,因素的一次项(X_1, X_2, X_3),因素的二次项($X_1^2, X_2^2,$

表 2 回归模型的方差分析

Table 2 Variance analysis of regression model

方差来源 Source	平方和 SS Square sum of deviations	自由度 DF df	均方 MS Mean quare	F 值 F value	P 值 P value	显著性 Significant
模型 Model	58.334	14	4.167	23.199	0.001	**
X_1	4.344	1	4.344	24.186	0.001	**
X_2	6.344	1	6.344	35.320	0.001	**
X_3	1.207	1	1.207	6.717	0.021	**
X_4	0.323	1	0.323	1.801	0.201	
X_1X_2	3.045	1	3.045	16.954	0.001	**
X_1X_3	0.001	1	0.001	0.002	0.963	
X_1X_4	0.006	1	0.006	0.031	0.862	
X_2X_3	0.119	1	0.119	0.663	0.429	
X_2X_4	0.072	1	0.072	0.398	0.538	
X_3X_4	0.284	1	0.284	1.579	0.230	
X_1^2	2.628	1	2.628	14.631	0.002	**
X_2^2	12.257	1	12.257	68.242	0.001	**
X_3^2	2.050	1	2.050	11.412	0.005	**
X_4^2	36.827	1	36.827	205.042	0.001	**
残差 Residual error	2.515	14	0.180			

续表 2(Continued Tab. 2)

方差来源 Source	平方和 SS Square sum of deviations	自由度 DF df	均方 MS Mean square	F 值 F value	P 值 P value	显著性 Significant
失拟 Lack of fit	2.472	10	0.247	23.361	0.004	* *
误差 Error	0.042	4	0.011			
总变异 Cor total	60.848	28				
模型的调整决定系数 Adjust of model determination coefficient $R^2_{adj} = 0.9174$			模型的决定系数 Model determination coefficient $R^2 = 0.9587$			

注: * 在 $\alpha = 0.05$ 水平上显著, ** 表示在 $\alpha = 0.01$ 水平上极显著。

Note: * Indicates significant at $\alpha = 0.05$ level, ** Indicates extremely significant at $\alpha = 0.01$ level.

2.2.2 多糖提取条件的响应面优化分析

为了更直观地表现二个因素对多糖提取得率的影响,绘制四因素交互作用的响应面图(图 5),由图 5 可知,响应面开口向下,随着每两个因素的值增

加,响应值增大,当响应值增到极值后,又随着每两个因素的增加而逐渐减小。该模型有稳定点,且等高线图上的曲线都随着响应面的增加而形成一顶点,即较佳的蕨菜多糖提取得率。

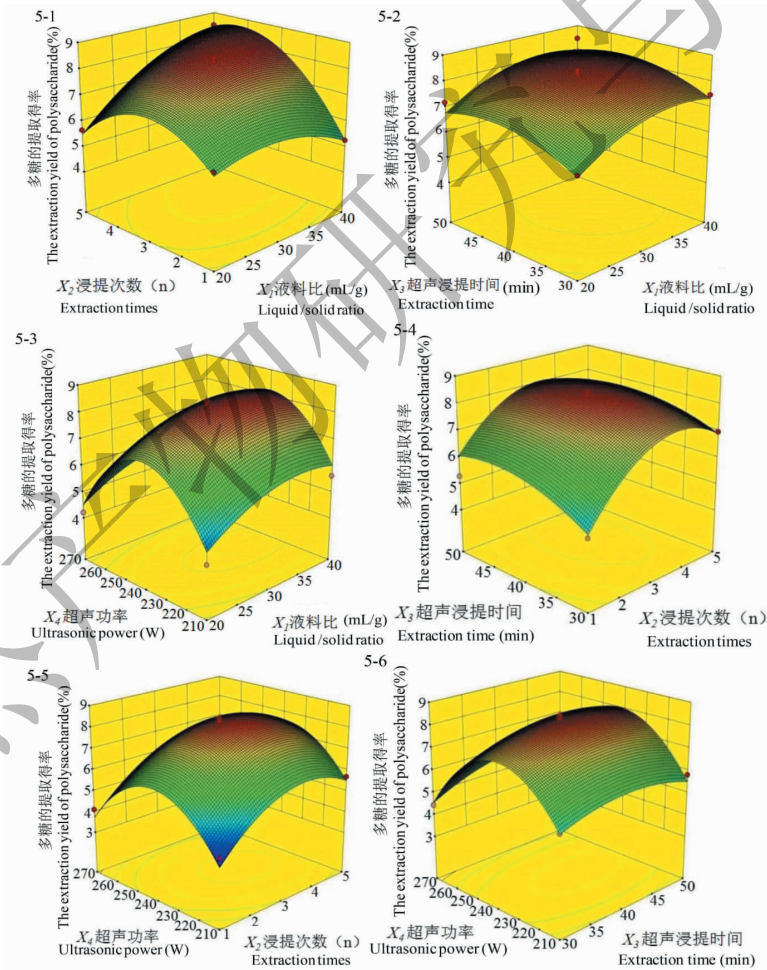


图 5 四因素交互作用对多糖提取得率的响应面图

Fig. 5 Response surface plots showing the cross interaction among four factors on extraction rate of polysaccharide

经 Design Expert 10.0 软件分析该模型得到的多糖优化提取条件为液料比:36.2:1 mL/g、超声浸

提时间:43.1 min、浸提次数:4.28 次、超声功率:239.17 W。在此条件下,蕨菜多糖理论提取得率达

8.72%。根据实际情况调整后的优化提取条件为:液料比:36.2:1 mL/g、超声浸提时间:43.1 min、浸提次数:4次、提取功率:240 W。在此条件下,重复

3次试验得多糖提取得率如表3所示,其提取得率为8.60%,预测值与实际值接近,因此该工艺参数可用来指导蕨菜多糖提取。

表3 预测值与优化工艺试验值的比较

Table 3 Comparison of simulation and optimized experimental results

编号 No.	提取得率 Test of yield polysaccharide (%)	平均提取得率 Mean of Yield polysaccharide (%)	预测得率 Predictive of yield polysaccharide (%)
1	8.53	8.60	8.72
2	8.62	-	-
3	8.65	-	-

2.3 蕨菜多糖药理活性研究

2.3.1 蕨菜多糖对脾细胞增值的影响

蕨菜多糖对小鼠脾细胞增值的影响如由图6所示,空白对照组与阳性对照组相比具有显著性差异($P < 0.05$),说明 ConA 诱导小鼠脾细胞增值,提示造模成功,药物组与空白对照组相比,(1~50 $\mu\text{g}/\text{mL}$)各组吸光度均有显著差异($P < 0.05$),提示该浓度范围内蕨菜多糖对诱导脾细胞增值具有明显的促进作用,且当蕨菜多糖的浓度达到1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,吸光度与空白对照组比较有显著差异($P < 0.05$),其对脾细胞增值具有抑制作用,因此表明蕨菜精制多糖在一定浓度范围内具有免疫增强活性。

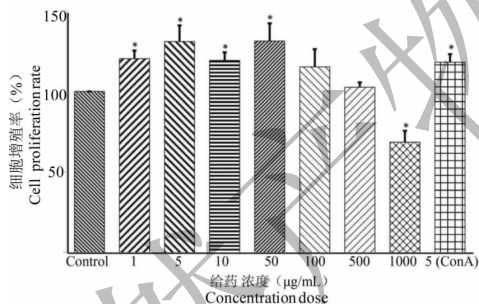


图6 蕨菜多糖对小鼠脾淋巴细胞增值的影响

Fig. 6 Effects of polysaccharide from *P. aquilinum* on proliferation of mice spleen lymphocyte

2.3.2 蕨菜多糖对肠癌细胞(HCT-8)的抑制效果

蕨菜多糖对结肠癌细胞 HCT-8 的抑制情况,使用 CCK-8 法检测细胞增值抑制情况,由图7可得,细胞增值抑制率与剂量(5~50 $\mu\text{g}/\text{mL}$)蕨菜多糖下呈依赖性抑制。且在该浓度范围内反应时间相同时,蕨菜多糖的浓度越大,细胞增值抑制率越高,与对照组比较具有显著性差异($P < 0.01$);当蕨菜多糖剂量增加到500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,细胞生长抑制率超过常用抗癌药物(100 nmol/L)紫杉醇对结肠癌细胞

HCT-8 的抑制率,结果为蕨菜多糖开发成抗癌药物提供一定参考。

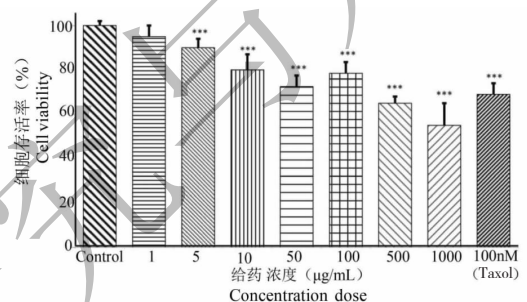


图7 蕨菜多糖对结肠癌细胞增值抑制的影响

Fig. 7 Effects of polysaccharide from *P. aquilinum* on inhibits the proliferation of HCT-8 cells

3 结论

采用响应面分析法优化蕨菜多糖提取工艺,得到优化工艺条件为:液料比:36.2:1 mL/g、超声浸提时间:43.1 min、浸提次数:4次、超声功率:240 W。在此条件下,蕨菜多糖中多糖的提取得率达8.60%,且各因素对多糖提取得率的影响依次为:浸提次数>液料比>超声浸提时间>超声功率,此提取工艺条件合理可行。

通过比较不同浓度的蕨菜精制多糖对小鼠脾细胞增值能力和抑制结肠癌细胞(HCT-8)增值能力的影响,结果表明:在一定浓度范围内蕨菜精制多糖能提高小鼠脾细胞增值率和抑制结肠癌细胞(HCT-8)的增值,提示蕨菜多糖在深度开发成提高免疫力和天然抗癌药物等领域具有较好的潜力。

参考文献

- Chen NF, Zhang L, Han BX, et al. Effects of *Pteridium aquilinum* flavanone on Life-span and reproduction performance in drosophila melanogaster[J]. Acta Nutrimenta Sinica(营养学报), 2007, 29: 625-626.